

**beta -(1->6) Bonded oligosaccharides, in particular 2-acetamido-2-deoxy-glucoses or -galactoses and their preparation**

No. Publication (Sec.) : FR2640628

Date de publication : 1990-06-22

Inventeur : DEFAYE JACQUES; GADELLE ANDREE; PEDERSEN CHRISTIAN

Déposant : COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE [FR];; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]

Numéro original :  FR2640628

No. d'enregistrement : FR19880016648 19881216

No. de priorité : FR19880016648 19881216

Classification IPC : A61K31/70; A61K31/73; C07H13/02; C07H19/04; C08B37/00

Classification EC : C07H13/04C, C08B37/00M3B

Brevets correspondants :

---

**Abrégé**

---

The invention relates to new (1->6) bonded oligosaccharides:  in which x is an integer ranging from 3 to 6, R<1> and R<2>, which are different, represent H or OH and R<3> is an amido or imido radical. These oligosaccharides may be prepared by dissolving the corresponding 2-acylamido- alpha -deoxy-hexose in hydrofluoric acid followed by a slow evaporation of the solution.

---

Données fournies par la base d'esp@cenet - I2

---

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

Déposée au greffe  
le 10 juillet 1980

(11) N° de publication : 2 640 628  
la réclame est pour les demandes et reçus

(21) N° d'enregistrement national : 88 16648

(31) Inv. C01 1-C02 N 13/02, 19/04; C03 B 37/00; A 61 K  
31/70, 31/73.

Oligosaccharides liés  $\beta-(1 \rightarrow 6)$ , en particulier des  
2-acétamido-2-désoxy-glucoses ou - galactoses, et  
leur préparation

(2) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

(22) Date de dépôt : 16 décembre 1980.  
(23) Priorité :  
1980, Examen et classement de brevets scientifiques, techniques et industriels et CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - FR.

(24) Inventeur(s) : Jacques Delave; Andréa Godella; Christian Pederen.

(25) Date de la mise à disposition du public de la demande : Brevet n° 25 du 22 juin 1980.  
Références à d'autres documents nationaux approuvés :

(26) Titulaire(s) :

(27) Mandataire(s) : Brevetma.

(28) Oligosaccharides liés  $\beta-(1 \rightarrow 6)$ , en particulier des 2-acétamido-2-désoxy-glucoses ou - galactoses et leur préparation.

(29) L'invention concerne de nouveaux oligosaccharides, liés  $\beta-(1 \rightarrow 6)$ , en particulier les oligosaccharides dérivés du 2-acétamido-2-désoxy-glucose et du 2-acétamido-2-désoxy-galactose, ainsi qu'un procédé pour la préparation d'oligosaccharides de 2-acétamido-2-désoxy-hexoses liés  $\beta-(1 \rightarrow 6)$  à partir des 2-acétamido-2-désoxy-hexoses correspondants ou à partir de polysaccharides naturels comportant ces unités liées par des ponts bêta-(1  $\rightarrow$  4) glycosidiques, comme le chitine.

(30) Ces oligosaccharides d'acétamido-hexoses liés  $\beta-(1 \rightarrow 6)$  ou leurs dérivés peuvent trouver des applications dans le domaine des immunostimulants. En effet, on sait que le lipide A qui est un composant de l'oligosaccharide de bactéries gram négatives et qui comporte un motif disaccharidique 2-acétamido-2-désoxy-D-glucopyranose (lié  $\beta-(1 \rightarrow 6)$ ) a des propriétés immunostimulantes.

(31) Les oligosaccharides d'acétamido-hexoses liés  $\beta-(1 \rightarrow 6)$  de l'invention peuvent aussi trouver d'autres applications, par exemple comme synthèse, agents thérapeutiques, agents anti-tumoraux ou agents choléstantifs.

(32) Les procédés connus actuellement pour préparer des oligosaccharides liés  $\beta-(1 \rightarrow 6)$  ont permis uniquement de préparer les structures caractéristiques du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucopyranose et du 2-acétamido-2-désoxy-D-galactopyranose.

(33) Dans le cas des oligosaccharides dérivés du glucose, la structure disaccharidique peut être

(11)

10  
15  
20  
25  
30  
35

Verso des brevets à l'INSTITUT NATIONAL, 27, rue de la Comète - PARIS PARIS CEDEX 15

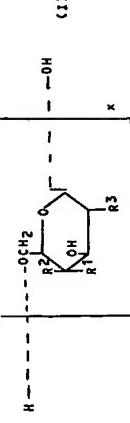
obtenue, soit par réversion du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucide en présence de vapeurs de chlorure d'hydrogène, ce qui conduit à un mélange anomérique, comme il est décrit par Foster et al dans J. Chem. Soc. (1958), p. 1890-94, soit par une suite de réactions en plusieurs étapes impliquant une condensation de type Koenigs-Knorr, comme il est décrit par Ercoffier et al dans Tetrahedron Lett., 50, (1972), p. 5055-5058 et par Bundle et al dans Carbohydr. Res., 21, (1972), p. 211-217.

Dans le cas des oligosaccharides dérivés du galactose, le disaccharide a pu être préparé en utilisant un procédé de condensation comme il est décrit par King et al dans Can. J. Chem., 53, (1975), p. 1970-72.

Ces procédés qui sont pour la plupart difficiles à mettre en œuvre ne conduisent pas à un rendement satisfaisant et ne permettent pas de produire et d'isoler les oligosaccharides holo-giques supérieurs recherchés, ayant un d.p. supérieur à 2.

La présente invention a précisément pour objet des oligosaccharides liés  $\beta-(1 \rightarrow 6)$  dérivés de 2-acylamido-2-désoxy-hexoses ou 2-acylamido-2-désoxy-hexoses, qui peuvent être préparés par des procédés plus faciles à mettre en œuvre, avec de bons rendements, en donnant la possibilité d'isoler les différents oligosaccharides produits.

Les oligosaccharides liés  $\beta-(1 \rightarrow 6)$  répondent à la formule :



30

dans laquelle  $x$  est un nombre entier allant de 3 à 6,

et  $\text{R}_1$  et  $\text{R}_2$  qui sont différents représentent H ou OH, et  $\text{R}_3$  est un radical choisi parmi les radicaux de formules :

$\text{-NHCOR}^4$ ,  $\text{-N} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{COR}^5$ ,  $\text{-N} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{(COR)}_2\text{R}^7$

dans lesquelles  $\text{R}^4$  représente un atome d'hydrogène,

un radical hydrocarboné, saturé ou insaturé, substitué ou non substitué, ou un radical aryle substitué ou non substitué,  $\text{R}^5$  et  $\text{R}^6$  qui peuvent être identiques ou différents représentent un atome d'hydrogène, un radical hydrocarboné, saturé ou insaturé, substitué ou non substitué ou un radical aryle substitué ou non substitué, et  $\text{R}^7$  représente un radical bivalent choisi parmi  $-\text{CH}_2\text{n}^-$  et  $\text{C}_6\text{H}_4^-$ .

Le rendement concerne également les énantiomères de la série L des oligosaccharides de formule

(II).

Selon un premier mode de réalisation de l'invention, il s'agit d'oligosaccharides du 2-acylamido-2-désoxy-D-glucopyranose liés  $\beta-(1 \rightarrow 6)$  répondant à la formule :

$\text{H} - \cdots - \left[ \begin{array}{c} \text{---OCH}_2 \\ | \\ \text{R}_2 \end{array} \right] \text{---} \left[ \begin{array}{c} \text{---O} \\ | \\ \text{R}_1 \end{array} \right] \text{---} \left[ \begin{array}{c} \text{---OH} \\ | \\ \text{R}_3 \end{array} \right] \cdots - \right]_x \quad (\text{II})$

dans laquelle  $x$  est un nombre entier de 3 à 6,

et  $\text{R}_1$  à la signification donnée ci-dessus, ainsi que leurs énantiomères de la série L.

dans laquelle  $x$  est un nombre entier allant de 3 à 6,  $\text{R}_1$  et  $\text{R}_2$  qui sont différents représentent H ou OH, et  $\text{R}_3$  est un radical choisi parmi les radicaux de formules :



dans lesquelles  $\text{R}^4$  représente un atome d'hydrogène, un radical hydrocarboné, saturé ou insaturé, substitué ou non substitué, ou un radical aryle substitué ou non substitué,  $\text{R}^5$  et  $\text{R}^6$  qui peuvent être identiques ou différents représentent un atome d'hydrogène, un radical hydrocarboné, saturé ou insaturé, substitué ou non substitué ou un radical aryle substitué ou non substitué, et  $\text{R}^7$  représente un radical bivalent choisi parmi  $-\text{CH}_2\text{n}^-$  et  $\text{C}_6\text{H}_4^-$ .

Le rendement concerne également les énantiomères de la série L des oligosaccharides de formule

(III).

Selon un premier mode de réalisation de l'invention, il s'agit d'oligosaccharides du 2-acylamido-2-désoxy-D-glucopyranose liés  $\beta-(1 \rightarrow 6)$  répondant à la formule :

$\text{H} - \cdots - \left[ \begin{array}{c} \text{---OCH}_2 \\ | \\ \text{R}_2 \end{array} \right] \text{---} \left[ \begin{array}{c} \text{---O} \\ | \\ \text{R}_1 \end{array} \right] \text{---} \left[ \begin{array}{c} \text{---OH} \\ | \\ \text{R}_3 \end{array} \right] \cdots - \right]_x \quad (\text{III})$

dans laquelle  $x$  est un nombre entier de 3 à 6,

et  $\text{R}_1$  à la signification donnée ci-dessus, ainsi que leurs énantiomères de la série L.

dans laquelle  $x$  est un nombre entier allant de 3 à 6,  $\text{R}_1$  et  $\text{R}_2$  qui sont différents représentent H ou OH, et  $\text{R}_3$  est un radical choisi parmi les radicaux de formules :



dans lesquelles  $\text{R}^4$  représente un atome d'hydrogène, un radical hydrocarboné, saturé ou insaturé, substitué ou non substitué, ou un radical aryle substitué ou non substitué,  $\text{R}^5$  et  $\text{R}^6$  qui peuvent être identiques ou différents représentent un atome d'hydrogène, un radical hydrocarboné, saturé ou insaturé, substitué ou non substitué ou un radical aryle substitué ou non substitué, et  $\text{R}^7$  représente un radical bivalent choisi parmi  $-\text{CH}_2\text{n}^-$  et  $\text{C}_6\text{H}_4^-$ .

Le rendement concerne également les énantiomères de la série L des oligosaccharides de formule

(IV).

Selon un premier mode de réalisation de l'invention, il s'agit d'oligosaccharides du 2-acylamido-2-désoxy-D-glucopyranose liés  $\beta-(1 \rightarrow 6)$  répondant à la formule :

$\text{H} - \cdots - \left[ \begin{array}{c} \text{---OCH}_2 \\ | \\ \text{R}_2 \end{array} \right] \text{---} \left[ \begin{array}{c} \text{---O} \\ | \\ \text{R}_1 \end{array} \right] \text{---} \left[ \begin{array}{c} \text{---OH} \\ | \\ \text{R}_3 \end{array} \right] \cdots - \right]_x \quad (\text{IV})$

dans laquelle  $x$  est un nombre entier de 3 à 6,

et  $\text{R}_1$  à la signification donnée ci-dessus, ainsi que leurs énantiomères de la série L.

dans laquelle  $x$  est un nombre entier allant de 3 à 6,  $\text{R}_1$  et  $\text{R}_2$  qui sont différents représentent H ou OH, et  $\text{R}_3$  est un radical choisi parmi les radicaux de formules :



dans lesquelles  $\text{R}^4$  représente un atome d'hydrogène, un radical hydrocarboné, saturé ou insaturé, substitué ou non substitué, ou un radical aryle substitué ou non substitué,  $\text{R}^5$  et  $\text{R}^6$  qui peuvent être identiques ou différents représentent un atome d'hydrogène, un radical hydrocarboné, saturé ou insaturé, substitué ou non substitué ou un radical aryle substitué ou non substitué, et  $\text{R}^7$  représente un radical bivalent choisi parmi  $-\text{CH}_2\text{n}^-$  et  $\text{C}_6\text{H}_4^-$ .

Le rendement concerne également les énantiomères de la série L des oligosaccharides de formule

(V).

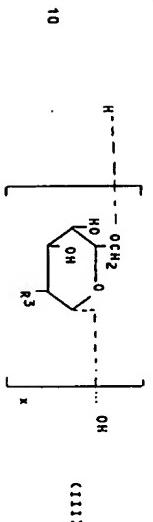
Selon un premier mode de réalisation de l'invention, il s'agit d'oligosaccharides du 2-acylamido-2-désoxy-D-glucopyranose liés  $\beta-(1 \rightarrow 6)$  répondant à la formule :

$\text{H} - \cdots - \left[ \begin{array}{c} \text{---OCH}_2 \\ | \\ \text{R}_2 \end{array} \right] \text{---} \left[ \begin{array}{c} \text{---O} \\ | \\ \text{R}_1 \end{array} \right] \text{---} \left[ \begin{array}{c} \text{---OH} \\ | \\ \text{R}_3 \end{array} \right] \cdots - \right]_x \quad (\text{V})$

dans laquelle  $x$  est un nombre entier de 3 à 6,

et  $\text{R}_1$  à la signification donnée ci-dessus, ainsi que leurs énantiomères de la série L.

Selon un second mode de réalisation de l'invention, il s'agit d'oligosaccharides du 2-système 2-désoxy-D-galactopyranose (1-6 8-(1-6) répondant à la formule :



15 dans laquelle  $x$  est un nombre entier de 3 à 6 et  
R<sub>3</sub> a la signification donnée ci-dessus, ainsi que  
leurs émanations de la série L.

Selon l'invention, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> et R<sub>6</sub> peuvent aussi représenter un radical aryle substitué ou non substitué, par exemple un radical phényle ou naphthyle.

Les substituants des radicaux hydrocarbonés ou des radicaux aryle utilisés pour R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> ou R<sub>6</sub> peuvent être de différents types. À titre d'exemple, de ces substituants, on peut citer les atomes d'halogène gène et les radicaux alcové de 1 à 4 atomes de carbone.

On peut également utiliser R<sub>3</sub> pour être un radical

Selon l'invention, R<sub>3</sub> peut être un résistance ou un diode.

A titre d'exemple, R<sub>5</sub> peut représenter HCOCH<sub>3</sub>, ou le radical anion de l'acide benzoïque ou méthoxy benzique.

Les oligosaccharides de l'invention peuvent être préparés facilement à partir du radical phthalido.

15 **2-acylamido-2-désoxyhexose correspondant.**  
 Aussi, l'invention a également pour objet un procédé de préparation d'oligosaccharides d'un 2-acylamido-2-désoxyhexose liés  $\beta$ -(1-4), qui consiste à préparer une solution d'un 2-acylamido-2-désoxyhexose de formule :



25 dans laquelle R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> et R<sup>3</sup> ont la signification donnée ci-dessus, ou de son éthanolate de la série L, dans du fluorure d'hydrogène de façon à former des ions glycosyl oxazolinium, et à évaporer ensuite lentement la solution.

30 Selon l'invention, le 2-cyclamido-2-désoxy-

-hexose peut être en particulier le 2-cyclamido-2-dé-

-soxy-glucose ou le 2-cyclamido-2-désoxy-D-galacto-

-se, par exemple le 2-cyclamido-2-désoxy-D-glucose ou le 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose.

35 Dans ce procédé, il semble que les ions

oxazolinium formés dans la solution soient l'entité réactive. Ainsi, ils permettent la réalisation de réactions de substitution intermoléculaires, extrêmement sélectives par l'hydrogène en position 6 d'autres unités hexopyranosidiques, lors de l'évaporation lente du fluorure d'hydrogène où la concentration du milieu devient propice à ce type d'autocondensation.

Dans ce cas, lorsque le radical acyle est un radical acétyle, on peut préparer les oligosaccharides du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucopyranose liés  $\beta-(1 \rightarrow 6)$  en préparant la solution de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose<sup>1</sup> par réaction de la chitine avec du fluorure d'hydrogène pendant une durée suffisante pour que la solution obtenue ne contienne que les fragments monosaccharidiques provenant de la dégradation de la chitine. On soumet ensuite cette solution à une évaporation lente pour obtenir les oligosaccharides recherchés.

On savait par Bosso et al dans Karbohid. Resur. 156, (1966), p. 57-68, que la fluorolyse de la chitine dans du fluorure d'hydrogène anhydre conduisait aux oligosaccharides liés  $\beta-(1 \rightarrow 4)$  du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucopyranose avec un bon rendement. Ainsi, pour des durées allant jusqu'à 24h, à 20°C la chitine était dégradée en donnant plusieurs types d'ion oxazolinium. Après 24h à 20°C, la chitine était complètement dégradée, et l'on ne trouvait plus en solution qu'un seul type d'ion oxazolinium. Cependant, selon cet article, en soumettant ensuite les produits à une hydrolyse, on obtenait les oligosaccharides liés  $\beta-(1 \rightarrow 4)$  correspondants ou l'unité monosaccharidique, soit

## Le 2-acétamido-2-désoxy-D glucose.

En revanche, dans le procédé de l'invention, on provoque une réaction de substitution intermoléculaire entre les unités monosaccharidiques par évaporation lente du fluorure d'hydrogène pour former les oligosaccharides liés  $\beta-(1 \rightarrow 6)$  correspondants.

Les réactions qui se produisent dans le procédé de l'invention sont représentées sur la figure annexe qui illustre la préparation d'oligosaccharides liés  $\beta-(1 \rightarrow 6)$  à partir de la chitine.

Sur cette figure, on voit que la chitine de formule (IV) se dégrade, par dissolution dans le fluorure d'hydrogène anhydre à 20°C, pour former des fluorures d'oligosaccharides liés  $\beta-(1 \rightarrow 4)$  de formule (V) et (VI) si la durée n'excède pas 8h. Après 8h de maintien dans le fluorure d'hydrogène à 20°C, on obtient uniquement le fragment monosaccharidique de formule (VII) sous la forme de l'ion furanopropyl oxazolinium. Cet ion se transforme par autocondensation, lors de l'évaporation de l'acide fluorhydrique, en l'oligosaccharide lié  $\beta-(1 \rightarrow 6)$  de formule (V).

Ainsi, selon l'invention, lorsqu'on part de la chitine, on laisse la réaction de fluorolyse se poursuivre pendant une durée suffisante pour que seul le fragment monosaccharidique correspondant puisse être détecté dans le milieu réactionnel, par exemple par la technique de résonance magnétique nucléaire du  $^{13}C$ , les caractéristiques de ce fragment monosaccharidique sous la forme de cation glycosyl oxazolinium étant les suivantes :

Cette durée est généralement de 8 à 10h.

10  
15  
20  
25  
30  
35

Le 2-acétamido-2-désoxy-D glucose.  
En revanche, dans le procédé de l'invention, on provoque une réaction de substitution intermoléculaire entre les unités monosaccharidiques par évaporation lente du fluorure d'hydrogène pour former les oligosaccharides liés  $\beta-(1 \rightarrow 6)$  correspondants.  
Les réactions qui se produisent dans le procédé de l'invention sont représentées sur la figure annexe qui illustre la préparation d'oligosaccharides liés  $\beta-(1 \rightarrow 6)$  à partir de la chitine.  
Sur cette figure, on voit que la chitine de formule (IV) se dégrade, par dissolution dans le fluorure d'hydrogène anhydre à 20°C, pour former des fluorures d'oligosaccharides liés  $\beta-(1 \rightarrow 4)$  de formule (V) et (VI) si la durée n'excède pas 8h. Après 8h de maintien dans le fluorure d'hydrogène à 20°C, on obtient uniquement le fragment monosaccharidique de formule (VII) sous la forme de l'ion furanopropyl oxazolinium. Cet ion se transforme par autocondensation, lors de l'évaporation de l'acide fluorhydrique, en l'oligosaccharide lié  $\beta-(1 \rightarrow 6)$  de formule (V).  
Ainsi, selon l'invention, lorsqu'on part de la chitine, on laisse la réaction de fluorolyse se poursuivre pendant une durée suffisante pour que seul le fragment monosaccharidique correspondant puisse être détecté dans le milieu réactionnel, par exemple par la technique de résonance magnétique nucléaire du  $^{13}C$ , les caractéristiques de ce fragment monosaccharidique sous la forme de cation glycosyl oxazolinium étant les suivantes :  
( $\delta_{ppm}$ ,  $^{13}C$ ): 80,6 C-4, 114,0 C-1).

Lorsqu'on met en œuvre le procédé de l'invention, en partant d'un partant d'un 2-acétylido-2-désoxyhexose, on réalise la dissolution dans du fluorure d'hydrogène à 0°C et on agite la solution jusqu'à dissolution, tout en la laissant revenir à la température ambiante. Dans ce cas, il n'est pas nécessaire d'attendre pour former les ions oxazolinium et on peut réaliser immédiatement l'évaporation lente du fluorure d'hydrogène, en plongeant par exemple le récipient contenant la solution sous une bonne hotte pour concentrer la solution par évaporation du fluorure d'hydrogène. Cette évaporation est habituellement obtenue en 10 à 15h environ.

On dissout alors le résidu visqueux dans de l'eau, puis on neutralise la solution aqueuse, par exemple par addition de carbonate de calcium pulvérulent. Après filtration, on lyophilise la solution et on utilise le résidu pulvérulent comme produit de départ pour la séparation des différents oligosaccharides par chromatographie.

Cette séparation peut être réalisée par chromatographie d'exclusion de gel en utilisant par exemple le Bio-Gel P-4 avec l'acétate d'ammonium comme éluant ; dans le cas où les oligosaccharides sont produits à partir de la chitine, on effectue une première séparation chromatographique avec l'acétate d'ammonium comme éluant puis une seconde purification sur le même gel avec l'eau comme éluant.

Dans le cas où les oligosaccharides sont obtenus à partir d'une solution de 2-acétylido-2-désoxyhexose, on peut réaliser une seule séparation chromatographique sur le Bio-Gel P-4 en utilisant uniquement l'eau comme éluant.

Selon l'invention, on peut également

utiliser pour la préparation d'oligosaccharides tels que  $\beta-(1 \rightarrow 6)$  de 2-acétylido-2-désoxyhexoses différents d'un 2-acétylido-2-désoxy-glucose, des polysaccharides comportant le motif répétitif voulu en opérant dans des conditions sensiblement analogues à celles utilisées lorsqu'on part de la chitine. Dans ce cas, la solution est généralement maintenue à la température ambiante en vase clos, pendant 6 à 10h, de façon à permettre la fluorolyse complète des liaisons interosidiques présistantes dans le polysaccharide.

Après cette réaction, on évapore lentement le fluorure d'hydrogène et on peut séparer les oligosaccharides par chromatographie d'exclusion de gel comme précédemment. Pour tenir compte d'appareils éventuellement présentes provenant du produit de départ, il est préférable d'effectuer une séparation chromatographique en deux temps en utilisant successivement l'acétate d'ammonium, puis l'eau comme éluant.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront mieux à la lecture des exemples suivants bien entendu à titre illustratif et non limitatif.

Exemple 1 : Préparation d'oligosaccharides  $\beta-(1 \rightarrow 6)$  du 2-acétylido-2-désoxy-D-alucopyranose.

On dissout 5g de 2-acétylido-2-désoxy-D-glucose dans 10L de fluorure d'hydrogène anhydre à 0°C et on agite la solution à 20°C dans un récipient ouvert. Après 15h d'agitation, on obtient un résidu pâteux que l'on dissout dans 10L d'eau, contenant une quantité de carbonate de calcium pulvérulent suffisante pour neutraliser l'acidité résiduelle. Après filtration, on lyophilise la solution ce qui permet

10

d'obtenir 5g d'un mélange d'oligosaccharides bruts.

On sépare alors ce mélange par chromatographie d'exclusion de gel de la façon suivante :

L'appareillage est constitué d'une pompe à débit contrôlé Milton-Roy (minipompe A, 350 bars ; dospro, Pont St Pierre, France) réglée à un débit de 110ml/h, communiquée à 2 colonnes de verre 5x100cm (K50/100, Pharmacie, Uppsala) repliées de Bio-Gel P-4 (200-00mesh ; Pharmacia). On assure la détéction des produits en sortie de colonne par un réfractomètre (Waters, modèle R 401) monté en série. On dissout chaque échantillon de 10 dans 5ml d'eau et on l'introduit au sommet de la colonne par l'intermédiaire d'une boucle d'injection (Rhodyne, cotati, CA ; modèle 7010). On collecte automatiquement les fractions issues de la colonne toutes les 10min, et on réunit celles qui ont un volume hydrodynamique similaire, puis on les concentre et on les sèche par lyophilisation.

On réalise un seul cycle d'éution par l'eau.

On obtient ainsi 5 fractions d'oligosaccharides ayant un dp de 2 à 6. On détermine les caractéristiques de chaque fraction. Les résultats obtenus ainsi que les rendements en oligosaccharides sont donnés dans le tableau 1 annexé.

Les résultats de spectrométrie RMN du <sup>13</sup>C dans l'oxyde de deutérium utilisant le 1,4-dioxane (6 67,4) comme standard sont données dans le tableau 2.

Exemple 2 : Préparation d'oligosaccharides liés à-(1→6) du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucopyranose.

Dans cet exemple, on part de la chitine. Dans ce but, on ajoute 10g de chitine à 50ml de

11

fluorure d'hydrogène anhydre à une température de 0°C puis on agite la suspension pendant 10min jusqu'à dissolution tout en laissant la température remonter à la température ambiante. On abandonne alors la solution claire obtenue pendant 8 à 10h à la température ambiante dans un récipient fermé. On ouvre ensuite le récipient en le disposer sous une hache de façon à permettre l'évaporation du fluorure d'hydrogène. Après 15h, on obtient un résidu pâteux que l'on dissout dans 20ml d'eau, puis on ajoute à la solution du carbonate de calcium puisverulent jusqu'à réaction neutre.

On filtre alors la solution, puis on la lyophilise, et l'on obtient ainsi 12g d'un mélange brut d'oligosaccharides.

On sépare alors ce mélange par chromatographie.

La séparation chromatographique est réalisée dans les mêmes conditions que celles de l'exemple 1, sauf que l'on réalise deux cycles de séparation. Tout d'abord le mélange est fractionné en utilisant de l'acétate d'ammonium aqueux 50M assent à pH 4,5 par de l'acide acétique, comme éluant. On soumet ensuite les fractions récupérées à une chromatographie sur la même colonne en utilisant l'eau comme éluant. Les caractéristiques et les rendements en oligosaccharides, obtenus dans ces conditions sont sensiblement les mêmes que ceux obtenus dans l'exemple 1 et figurant dans les tableaux 1 et 2.

Exemple 3 : Préparation d'oligosaccharides liés à-(1→6) du 2-acétamido-2-désoxy-D-galactopyranose.

Dans cet exemple, on suit le même mode opératoire que dans l'exemple 1, sauf que l'on

utilise 5g de 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose.

au lieu de 59 de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose. Les caractéristiques et les rendements en oligosaccharides sont donnés dans le tableau 3 annexé.

Le tableau 6 illustre les résultats obtenus lors de l'analyse par résonance magnétique nucléaire du  $^{13}\text{C}$  des oligosaccharides séparés ayant des dp de 2, 3, 4. Ces mesures ont été effectuées en prenant comme étalon le 1,4-dioxane ( $\delta$  67,4).

Dans les exemples, on a utilisé des oses et polyosides de la série D mais il va de soi que les oses et les polyosides de la série L sont utilisables de la même façon et conduisent aux dérivés correspondants (oligosaccharides de la série L).

TABLEAU 1

Oligosac- charide	Rendement (%)	Point de fusion (°C)	$\left(\frac{\nu}{\nu}\right)_D^{25}$ ( $^{\circ}$ )	$m/z$ $[\text{H}+\text{H}]^+$	Analyse élémentaire					
					Calculée			Trouvée		
					C	H	N	C	H	N
x=2	30	163(dec.)	+0,7(4,55)	425	pour $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_{11}$ 45,28 6,64 6,60	45,42	6,81	6,39		
x=3	15	191-193(dec.)	-4,0(1,57)	628	pour $\text{C}_{24}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_{16}$ 45,93 6,57 6,69	45,73	7,01	6,45		
x=4	6,6	195-197(dec.)	-7,4(1,62)	831	pour $\text{C}_{32}\text{H}_{54}\text{N}_4\text{O}_{21}$ 46,26 6,54 6,74	45,77	6,99	6,73		
x=5	2	203-206(dec.)	-14,0(0,89)	1034	pour $\text{C}_{40}\text{H}_{67}\text{N}_5\text{O}_{26}$ 46,46 6,52 6,77	45,60	6,83	6,82		
x=6	1,3	205-207(dec.)	-20,0(0,72)	1237.	pour $\text{C}_{48}\text{H}_{89}\text{N}_6\text{O}_{31}$ 46,63 6,51 6,79	45,60	6,95	6,51		

TABLEAU 2

Oligosaccharide	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
x=2	91,70 (1) 95,82 (1) 102,49 (2) 102,59 (2)	54,86 (1) 57,54 (1) 56,32 (2) 	71,30 (1) 74,72 (1) 74,56 (2) 	70,92 (1) 70,74 (1) 70,74 (2) 	71,53 (1) 75,68 (1) 76,68 (2) 71,56 (1)	69,37 (1) 69,62 (1) 61,56 (2) 69,28 (1)
x=3	 91,70 (1) 95,83 (1) 102,47 (2) 102,56 (2)	54,87 (1) 57,57 (1) 56,27 (2) 56,31 (2)	71,26 (1) 74,73 (1) 74,54 (2) 74,51 (2)	70,93 (1) 70,76 (1) 70,76 (2,3) 70,68 (2,3)	71,56 (1) 75,61 (1) 75,49 (2) 76,69 (2)	69,54 (1) 69,33 (2) 61,55 (3) 69,25 (1)
x=4	91,70 (1) 95,83 (1) 102,45 (2) 102,53 (2)	54,88 (1) 57,58 (1) 56,32 (1C) 56,27 (2C)	71,22 (1) 74,77 (1) 74,55 (3C) 74,56 (4C)	70,95 (1) 70,76 (1) 70,76 (1C) 70,81 (2C)	71,57 (1) 75,58 (1) 75,46 (2,3) 75,42 (2)	69,51 (1) 69,33 (2C) 61,56 (4) 69,29 (1)
x=5	 91,70 (1) 95,83 (1) 102,38 (4C)	54,88 (1) 57,58 (1) 56,32 (2C)	71,22 (1) 74,56 (1) 74,56 (4C)	70,83 (1) 70,74 (1) 70,83 (2C)	71,57 (1) 75,46 (1) 75,45 (1C)	69,76 (1) 69,30 (3C) 61,57 (5) 76,71 (5)

( )<sup>a</sup>. Les nombres entre parenthèses caractérisent l'unité 2-acétamido-2-désoxy-D-glucopyranosyle, numérotée à partir de l'extrémité à laquelle appartiennent les carbones considérés.

14

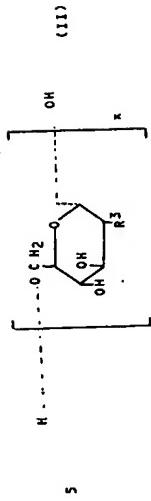
26406218

TABLEAU 3

Oligosaccharide	Rendement (%)	Point de fusion (°C)	$[\eta]_D^{25}$ (cm <sup>3</sup> ·g <sup>-1</sup> )	$m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	Analyse élémentaire					
					Calculée			Trouvée		
					C	H	N	C	H	N
x=2	28	182	+46,0 (2,05)	425	pour C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>11</sub> 45,3 6,6 6,6	45,92	6,81	6,39		
x=3	21	202	+32,5 (0,73)	628	pour C <sub>24</sub> H <sub>44</sub> N <sub>3</sub> O <sub>16</sub> 45,9 6,6 6,7	45,73	7,01	6,45		
x=4	11	178-179	+31,5 (0,9)	831	pour C <sub>32</sub> H <sub>54</sub> N <sub>4</sub> O <sub>21</sub> 46,3 6,5 6,7	45,77	6,99	6,73		
x=5	6	201	+30,5 (0,75)	1034	pour C <sub>40</sub> H <sub>67</sub> N <sub>5</sub> O <sub>26</sub> 46,5 6,5 6,8	45,60	6,83	6,82		
x=6	2,6	215-216	+28,5 (0,4)	1237	pour C <sub>48</sub> H <sub>80</sub> N <sub>6</sub> O <sub>31</sub> 46,6 6,5 6,8	45,1	6,95	6,51		

15

2640628



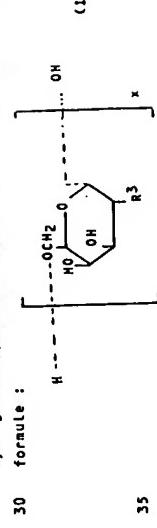
10

dans laquelle x est un nombre entier de 3 à 6, et R3 est choisi parmi les radicaux de formule :



dans lesquelles R4 représente un atome d'hydrogène, un radical hydrocarboné, saturé ou insaturé, substitué ou non substitué, R5 et R6 qui peuvent être identiques ou non substitués, R5 et R6 qui peuvent être identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène, un radical hydrocarboné, saturé ou insaturé, substitué ou non substitué ou un radical aryle substitué ou non substitué, et R7 représente un radical bivalent choisi parmi -(CH2)<sub>n</sub>- et avec n étant un nombre entier de 2 à 10, et leurs énantiomères de la série L.

3. Oligosaccharides du 2-acylamido-2-désoxy-hexose de formule :



35

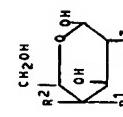
dans laquelle x est un nombre entier de 3 à 6 et R3 est choisi parmi les radicaux de formule :



dans lesquelles R4 représente un atome d'hydrogène, un radical hydrocarboné, saturé ou insaturé, substitué ou non substitué, R5 et R6 qui peuvent être identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène, un radical hydrocarboné, saturé ou insaturé, substitué ou non substitué ou un radical aryle substitué ou non substitué, et R7 représente un radical bivalent choisi parmi -(CH2)<sub>n</sub>- et avec n étant un nombre entier de 2 à 10, et leurs énantiomères de la série L.

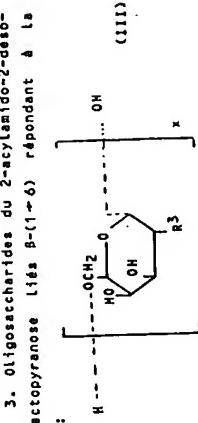
4. Oligosaccharides selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisés en ce que R3 est le radical  $\text{RNCOCH}_3$ .

5. Procédé de préparation d'oligosaccharides d'un 2-acylamido-2-désoxy-hexose liés B-(1→6), caractérisé en ce qu'il consiste à préparer une solution d'un 2-acylamido-2-désoxy-hexose de formule :



30

35



35

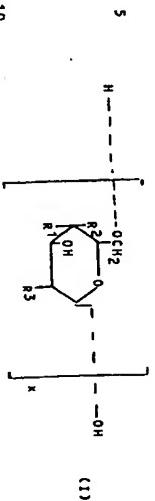
TABLEAU 4

Oligosaccharide	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
$x=2$	91,89 (r)	51,11 (n)	68,08 (r)	69,34 (r)	69,88 (r)	69,88 (r)
	96,20 (p)	54,60 (f)	71,80 (f)	68,63 (f)	74,47 (f)	69,80 (f)
	102,90 (2) a 103,01 (2)	53,22 (2) a	71,80 (2) a	68,63 (2) a	75,96 (2) a	61,83 (2) b
$x=3$	91,89 (r)	51,11 (n)	68,09 (r)	69,34 (r)	69,82 (r)	69,82 (r)
	96,25 (f)	54,61 (f)	71,78 (f)	68,65 (f)	74,44 (f)	69,82 (f)
	102,77 (2c)	53,21 (2c)	71,78 (2c)	68,65 (2c)	75,96 (2c)	61,86 (3) a
$x=4$	91,89 (r)	51,12 (n)	68,09 (r)	69,34 (n)	69,71 (n)	69,82 (r)
	96,25 (n)	54,61 (f)	71,79 (f)	68,65 (f)	74,40 (f)	69,82 (f)
	102,83 (3c)	53,22 (2c)	71,79 (2c)	68,64 (3c)	75,97 (3c)	61,86 (4) b
			53,15 (1c)	71,64 (1c)		

( ) a. Les nombres entre parenthèses caractérisent l'unité 2-acétamido-2-désoxy-D-galactopyranosyle, numérotée à partir de l'extrémité réductrice à laquelle appartiennent les carbones considérés.

## REVERDISSAONS

1. Oligosaccharides liés  $\beta(1 \rightarrow 6)$  répondant à la formule :



dans laquelle  $x$  est un nombre entier allant de 3 à 6,  $R^1$  et  $R^2$  qui sont différents, représentent H ou OH, et  $R^3$  est choisi parmi les radicaux de formule :



20 dans lesquelles  $R^4$  représente un atome d'hydrogène, un radical hydrocarboné, saturé ou insaturé, substitué ou non substitué, ou un radical aryle substitué ou non substitué,  $R^5$  et  $R^6$  qui peuvent être identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène, un radical hydrocarboné, saturé ou insaturé, substitué ou non substitué ou un radical aryle substitué ou non substitué, et  $R^7$  représente un radical bivalent choisi parmi  $-(\text{CH}_2)_n-$  et  $\text{C}_6\text{H}_4-$  avec  $n$  étant un nombre entier de 2 à 10, et leurs énumérations de la série L.

21 2. Oligosaccharides du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucopyranose liés  $\beta(1 \rightarrow 6)$  répondent à la formule :

dans laquelle R<sup>1</sup> et R<sup>2</sup> qui sont différents, représentent H ou OH, et R<sup>3</sup> est choisi parmi les radicaux de formule :



9. Procédé selon la revendication 7 de préparation d'oligosaccharides du 2-cétaïdo-2-déoxy-D-galactopyranose litié  $\beta-(1 \rightarrow 6)$ , caractérisé en ce qu'il consiste à préparer une solution du 5 2-cétaïdo-2-déoxy-D-galactose dans du fluorure d'hydrogène et à évaporer ensuite lentement la solution.

dans lesquelles R<sup>4</sup> représente un atome d'hydrogène, un radical hydrocarboné, saturé ou insature, substitué ou non substitué, ou un radical aryle substitué ou non substitué, R<sup>5</sup> et R<sup>6</sup> qui peuvent être identiques ou différents représentant un atome d'hydrogène, un radical hydrocarboné, saturé ou insature, substitué ou non substitué ou un radical aryle substitué ou non substitué, et R<sup>7</sup> représente un radical bivalent choisi parmi -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- et  $\text{OC}_6\text{H}_4\text{OC}_6\text{H}_4-$  avec n étant un nombre entier de 2 à 10, ou de son équivalente de la série L, dans du fluorure d'hydrogène de façon à former des ions glycosylcycloazolinium, et à évaporer ensuite lentement la solution.

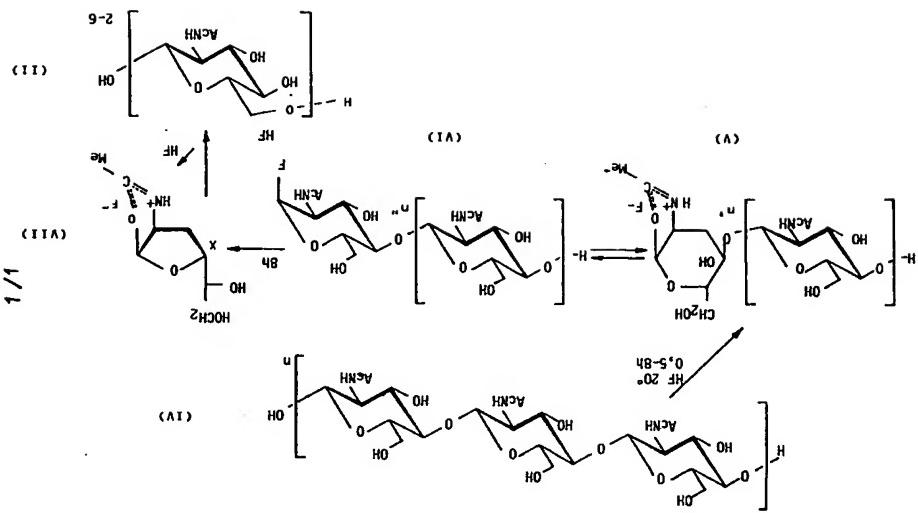
6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'hexose est le glucose.

7. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'hexose est le galactose.

25 8. Procédé selon la revendication 5 de préparation d'oligosaccharides du 2-cétaïdo-2-déoxy-D-glucopyranose litié  $\beta-(1 \rightarrow 6)$ , caractérisé en ce que l'on prépare la solution de 30 2-cétaïdo-2-déoxy-D-glucose par réaction de la chitine avec du fluorure d'hydrogène pendant une durée suffisante pour que la solution obtenue ne contienne que les fragments monosaccharidiques provenant de la dégradation de la chitine.

2640628

1 / 1



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)